

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології**

**СТАН ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ В СКЕЛЕТНИХ
М'ЯЗАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ
АЦЕТАМІНОФЕНОМ НА ТЛІ ДЕФЦИТУ ПРОТЕЇНУ**

**Магістерська робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)**

Виконав:

студент 6 курсу, 600М група

Соколов Олександр Іванович

Керівник:

кандидат біологічних наук,

доцент **Волощук О.М.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри

протокол № _____ від _____ 2023 р.

Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці – 2023

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена дослідженню активності вільнорадикальних процесів у мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі дефіциту протеїну.

Встановлено, що тварини, які споживали низькопротеїновий раціон, не демонстрували значущих змін у показниках генерації супероксид-аніон радикалу, вмісту ТБК-активних продуктів та карбонільних похідних, а також активності супероксиддисмутази у скелетних м'язах у порівнянні з контрольною групою. Водночас у тварин цієї групи спостерігалось достовірне збільшення генерації гідроксильного радикалу та зменшення вмісту білкових SH-груп.

У тварин, які отримували токсичні дози ацетамінофену, виявлено достовірне підвищення генерації супероксид-аніон радикалу та гідроксильного радикалу, а також збільшення вмісту ТБК-активних продуктів та карбонільних похідних зі зменшенням вмісту білкових SH-груп в порівнянні з контрольною групою на тлі збереження активності супероксиддисмутази. Максимально виражені вільнорадикальні процеси характерні для тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном, яких утримували за умов білкової недостатності, про що свідчить інтенсифікація генерації АФК, накопичення продуктів окиснювального ушкодження ліпідів та протеїнів на тлі зниження активності супероксиддисмутази.

Отже, введення ацетамінофену на тлі дефіциту протеїну у раціоні індукує вільнорадикальні процеси у скелетних м'язах щурів, наслідком чого може бути порушення функціональної активності клітин скелетних м'язів, зокрема їх скоротливої здатності.

Ключові слова: ацетамінофен, скелетні м'язи, низькопротеїновий раціон, супероксид-аніон радикал, гідроксильний радикал, вільнорадикальні процеси.

ABSTRACT

The master's thesis is devoted to the study of the activity of free radical processes in the mitochondrial fraction of skeletal muscles of rats under conditions of toxic damage with acetaminophen against the background of protein deficiency.

It was established that animals that consumed a low protein diet did not show significant changes in the indicators of superoxide anion radical generation, the content of TBC-active products and carbonyl derivatives, as well as the activity of superoxide dismutase in skeletal muscles in comparison with the control group. At the same time, a significant increase in the generation of hydroxyl radicals and a decrease in the content of protein SH-groups were observed in animals of this group. In animals that received toxic doses of acetaminophen, a significant increase in the generation of superoxide anion radical and hydroxyl radical, as well as an increase in the content of TBC-active products and carbonyl derivatives with a decrease in the content of protein SH-groups compared to the control group, against the background of preservation of superoxide dismutase activity, was revealed. Free radical processes are maximally expressed, characteristic of animals with toxic acetaminophen formation, which were kept under conditions of protein deficiency, which negatively affects the intensification of ROS generation, the accumulation of products of oxidative damage to lipids and proteins against the background of a decrease in superoxide dismutase activity.

Therefore, the introduction of acetaminophen against the background of protein deficiency in the diet induces free radical processes in the skeletal muscles of rats, which may result in a violation of the functional activity of skeletal muscle cells, including their contractile ability.

Key words: acetaminophen, skeletal muscles, low-protein diet, superoxide anion radical, hydroxyl radical, free radical processes.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ **О.І. Соколов**

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Механізми токсичності ацетамінофену.....	7
1.2. Утворення супероксиду та мітохондріальна дисфункція при отруєнні ацетамінофеном.....	9
1.3. Особливості процесу пероксидного окислення ліпідів.....	14
1.4. Механізм окиснювального ушкодження білків.....	16
1.5. Особливості функціонування м'язів за умов оксидативного стресу.....	21
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	25
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	30
ВИСНОВКИ.....	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	40
ДОДАТКИ.....	

ВСТУП

Ацетамінофен, популярний препарат для знеболення в скелетних м'язах, але при передозуванні може призводити до окиснювального стресу через утворення токсичних метаболітів [1]. Хоча його безпечність у встановлених дозах відома, передозування може спричинити ураження різних органів, зокрема печінки, нирок та, як виявлено, скелетних м'язів. Оскільки м'язи важливі для опорно-рухової системи, токсичне ураження може вплинути на їх функціональну активність, а зниження ефективності мітохондрій, основних виробників енергії та вільних радикалів, може відігравати ключову роль у цьому процесі [2].

Дослідження показали [3], що токсичне ураження скелетних м'язів за умов дефіциту білка в раціоні викликає зниження ферментативної активності комплексів дихального ланцюга мітохондрій. Це приводить до гальмування їхньої активності та збільшення продукції активних форм кисню.

Важливо підкреслити, що білки є основою для розвитку та підтримки клітин в нормальному стані у людському організмі, а недостатнє надходження білка може мати негативні наслідки для здоров'я.

Мета роботи – дослідження активності вільнорадикальних процесів в скелетних м'язах щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі дефіциту протеїну.

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Визначити генерацію супероксид-аніон радикалу ($O_2^{\cdot-}$) та гідроксильного радикалу (HO^{\cdot}) у мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі дефіциту протеїну.

2. Визначити вміст ТБК-активних продуктів, карбонільних похідних та білкових SH-груп у мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі дефіциту протеїну.

3. Визначити активність супероксиддисмутази у мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі дефіциту протеїну.

I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Механізми токсичності ацетамінофену

Ацетамінофен (АРАР) – один з найпоширеніших знеболювальних та жарознижувальних препаратів, що використовуються у світі [1]. Хоча препарат безпечний та ефективний у терапевтичних дозах, терапевтичне вікно є вузьким, а передозування викликає гепатотоксичність. Повсюдне поширення та широка доступність препарату призвели до того, що гепатотоксичність АРАР є найчастішою причиною гострої печінкової недостатності (ГПН) у США та інших західних країнах [2]. Десятиліття досліджень механізмів ураження печінки, спричиненого АРАР, дозволили отримати значне розуміння ролі метаболізму ацетамінофену та утворення його реактивного метаболіту в ініціюванні каскаду реакцій, що в кінцевому підсумку призводять до ураження печінки.

При споживанні в терапевтичних дозах більша частина (80%-90%) АРАР кон'югується з глюкуроною кислотою або сульфатом і виводиться через нирки [4]. Незначна частина піддається дії ферментів цитохрому P₄₅₀, таких як Cyp2E1 та Cyp1A2, з утворенням реактивного метаболіту N-ацетил-*n*-бензохінон-іміну (NAPQI) [5]. Незважаючи на високу реакційну здатність, NAPQI рідко виявляється токсичним після споживання терапевтичних доз, оскільки він швидко кон'югується з великими запасами глутатіону в печінці та виводиться з жовчю. Однак це контрастує зі сценарієм виникнення передозування АРАР, в результаті якого шлях сульфатації (пере-)насичується [4], а інтенсивність утворення NAPQI значно підвищується, незважаючи на високу продуктивність шляху глюкуронізації [6]. Надмірне утворення NAPQI призводить до його активної реакції з печінковим глутатіоном і подальшого швидкого виснаження його запасів в печінці. Внаслідок цього вільний реактивний NAPQI стає доступним для реакції з сульфгідрильними групами білків з утворенням білкових адуктів АРАР [4]. Надалі відбувається порушення цілісності компонентів електронотранспортного ланцюга, АТФ-

синтази, що ставить під загрозу функцію дихального ланцюга і посилює генерацію вільних радикалів, таких як супероксид.

Супероксид реагує з оксидом азоту (NO) в мітохондріях, утворюючи високоактивний пероксинітрит, який нітрує мітохондріальні білки, такі як супероксиддисмутаза (MnSOD). Це порушує антиоксидантний захист мітохондрій, викликаючи мітохондріальний окисний стрес і окислення білків, таких як, наприклад, мітохондріальний тіоредоксин. У цитозолі окислення тіоредоксину призводить до його від'єднання від зв'язуючого партнера – апоптозної сигнально-регулюючої кінази 1 (ASK1), яка потім активується. ASK1 разом з активованою кіназою змішаного типу 3 (MLK3) активує *c-jun* N-кінцеву кіназу (JNK) до її фосфорильованої форми через MKK4-фосфорилування. Фосфорильована JNK транслокується до мітохондрій і зв'язується з Sab на зовнішній мітохондріальній мембрані, яка через Src-опосередкований шлях ще більше пригнічує процес мітохондріального транспорту електронів. Це індукує мітохондріальний оксидативний стрес, який посилюється транслокацією Вах-білків і глікогенсинтази кінази-3 β (GSK-3 β) з цитозолу в мітохондрії. Ці події підвищують мітохондріальну проникність, в результаті якої вивільняються мітохондріальні інтермембранні білки, такі як ендонуклеаза G і фактор, що індукує апоптоз (AIF), разом з цитохромом *c* і *Smac*-білками. Транслокація AIF та ендонуклеази G до ядра індукує фрагментацію ядерної ДНК, що разом з активацією рецептор-взаємодіючих протеїнкіназ 3/1 (RIP3/RIP1) врешті-решт викликає некроз.

На метаболізм АРАР можуть впливати генотипові відмінності, а варіації глюкуронізації спостерігаються в різних популяціях через поліморфізм ферментів УДФ-глюкуронозилтрансферази (UDP-глюкуронозилтрансферази, UGT). Нещодавно було показано, що особи з генотипом UGT2B15 *2/*2 мають вищі концентрації адуктів білків АРАР, ніж особи з генотипами *1/*2 та *1/*1 [7]. Утворення білкових адуктів АРАР та їх вивільнення в кровообіг, на сьогодні, є сферами інтенсивного вивчення

через клінічні наслідки в лікуванні пацієнтів з передозуванням АРАР, головним чином тому, що білкові адукти АРАР, ймовірно, є біомаркерами, корисними для діагностики передозування АРАР [8]. Однак білкові адукти також виявляються у переважній більшості осіб, які приймають терапевтичні дози АРАР [9], а комплекс АРАР-цистеїн може бути виявлений після багаторазового надтерапевтичного прийому АРАР за відсутності гепатотоксичності [10]. Хоча клінічна корисність визначення білкового адукту АРАР у цьому контексті була поставлена під сумнів [11], нещодавно був розроблений та запропонований специфічний конкурентний імуноферментний аналіз (AcetaSTAT), спрямований на ідентифікацію людей з АРАР-індукованим гострим пошкодженням або печінковою недостатністю [12]. З огляду на ці клінічні наслідки, краще розуміння утворення білкового адукту та його зв'язку з некрозом гепатоцитів є виправданим. Раніше вважалося, що, з точки зору самого механізму, рівень глутатіону повинен бути значно виснаженим, перш ніж NAPQI вступить у реакцію з білками [13]. Однак, останні дані свідчать про те, що це може бути не так, оскільки було виявлено, що білкові адукти NAPQI утворюються навіть при використанні терапевтичних доз АРАР [4, 9]; фактично, білкові адукти утворюються до значного виснаження GSH [7]. Замість того, щоб оцінювати загальне утворення білкових адуктів у клітині, яке спочатку вважалося критичним для загибелі клітини [14], тепер виявляється, що утворення білкових адуктів у мітохондріальних білках є найбільш небезпечним [15].

1.2. Утворення супероксиду та мітохондріальна дисфункція при отруєнні ацетамінофеном

Супероксид – це первинний вид активних форм кисню (АФК), який утворюється в результаті численних ферментативних і неферментативних реакцій, що використовують молекули кисню як акцептор електронів [16]. Ферментативні шляхи утворення супероксиду поділяються на дві категорії. Один клас ферментів виробляє супероксид і, в деяких випадках, пероксид

водню або інші органічні пероксиди як основні продукти зі стехіометричним споживанням кисню. Інший клас іноді виробляє супероксид як побічний продукт, і цей процес залежить від умов навколишнього середовища.

Існує ціла низка процесів і реакцій, результатом яких стає утворення супероксиду, наприклад, робота мітохондріального дихального ланцюга, утилізація електронів з NADPH за допомогою мембранних оксидаз, функціонування систем цитохрому P₄₅₀ (CYP)/ цитохром P₄₅₀ редуктази (POR), окислення сульфгідрильних груп за участі ксантиноксидоредуктази, неферментативні шляхи утворення тощо.

Вважається, що продукування супероксидів у відповідь на інтоксикацію АРАР здебільшого відбувається саме в процесі функціонування дихального ланцюга мітохондрій. Під час метаболізму вуглеводів через гліколіз і цикл трикарбонових кислот (ТБК) електрони акцептуються у формі NADH і FADH₂. У мітохондріальному електронотранспортному ланцюзі (ЕТЛ) з електрона поступово вивільняється вільна енергія. ЕТЛ-I (NADH-убіхінон-оксидоредуктаза), ЕТЛ-III (комплекс цитохрому *bc*, убіхінол-цитохром *c*-редуктаза) і ЕТЛ-IV (цитохром *c*-оксидаза) діють як протонний насос, використовуючи енергію електронів і підвищуючи електрохімічний потенціал на внутрішній мембрані мітохондрій. ЕТЛ-V (FoF₁-АТФаза) – це молекулярна турбіна, яка синтезує АТФ, використовуючи створений електрохімічний потенціал.

Зрештою, ЕТЛ споживає понад 95% кисню, що вдихається [17,18]. Під час цих процесів електрон помилково передається молекулі кисню, утворюються аніони супероксиду. Цей витік електронів й робить мітохондріальні ЕТЛ основними джерелами супероксиду [19]. Ішемічна ситуація супроводжується дефіцитом молекул кисню, що призводить до утримання електронів у дихальному ланцюзі. При реоксигенації молекули кисню, що повертаються, мають тенденцію приймати ці електрони і стають супероксидом перед тим, як перетворитися на воду у ЕТЛ-IV. Таким чином, ішемія-реперфузія зазвичай посилює вироблення мітохондріального

SOD каталізують розщеплення супероксиду ($O_2^{\cdot-}$), утворюючи пероксид водню (H_2O_2). Каталаза (CAT), глутатіонпероксидази (GPX) і PRX перетворюють H_2O_2 на воду. H_2O_2 може реагувати з окислювально-відновлювальними металами (напр., залізом) з утворенням гідроксильного радикала (OH^{\cdot}) через реакцію Фентона/Хабера-Вайса. Реакція між $O_2^{\cdot-}$ та оксидом азоту (NO^{\cdot}) утворюється $ONOO^{\cdot}$, розкладання якого, в свою чергу, призводить до утворення деяких високоокислювальних проміжних продуктів зокрема NO_2^{\cdot} , OH^{\cdot} і $CO_3^{\cdot-}$ а також, зрештою, стабільний NO_3^- . Таким чином, підвищений рівень кисню $O_2^{\cdot-}$ може також зменшити біодоступність NO^{\cdot} і генерувати токсичність $ONOO^{\cdot}$. $O_2^{\cdot-}$ сам по собі може відновлювати двовалентне залізо (Fe^{3+}) до тривалентного заліза (Fe^{2+}) у залізо-сірчаних центрах білків, що призводить до зниження активності ферментів і супутньої втрати Fe^{2+} з ферментів, що, в свою чергу, призводить до активації реакції Фентона. Реакція протонування $O_2^{\cdot-}$ може утворювати більш реактивний гідропероксильний радикал (HO_2^{\cdot}). Ссавці мають три форми: SOD₁, SOD₂ і SOD₃, які вперше були виявлені в еритроцитах, м'язах і легенях відповідно, і зараз відомо, що вони досить широко представлені в організмі.

Гідроксильний радикал (OH^{\cdot}) є найбільш реактивним радикалом кисню [26], який зустрічається в біологічних системах. OH^{\cdot} -радикали, які беруть участь у низці реакцій, індукують розриви ланцюгів ДНК, приєднуючись до структури основ ДНК і РНК, чим завдають значної шкоди основам і вуглеводам ДНК. Якщо пошкодження дуже сильне, воно не може бути виправлене захисними системами клітини, і в результаті виникають мутації і смерть клітини [27-29]. Постійна концентрація OH^{\cdot} -радикалів в природних умовах дорівнює нулю, оскільки вони реагують з кожною молекулою живої клітини в місці утворення або поблизу нього. Вважається, що висока реакційна здатність гідроксильного радикалу OH^{\cdot} є результатом поєднання трьох властивостей. Ці властивості включають високу електрофільність, високу термохімічну реакційну здатність і здатність утворюватися поблизу молекул-мішеней [30]. Утворення OH^{\cdot} було досягнуто в еритроцитах під дією

адриаміцину за допомогою методу електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) зі спіновою пасткою [31]. Більша частина OH^\bullet , отриманого *in vivo* або *in situ*, була отримана в результаті розкладання H_2O_2 [32] за допомогою каталізу Fe (II). Крім того, OH^\bullet може продукуватися різними джерелами: сонячним світлом, ультрафіолетовим випромінюванням [33], іонізуючим опроміненням, реакцією хлоридної кислоти з O_2^- та сонолізом води (ультразвуком) [34].

Реакцію OH^\bullet -радикала можна інгібувати за допомогою поглиначів OH^\bullet , таких як метанол, етанол, 1-бутанол, маніт, форміат, тіосечовина, диметилтіосечовина, глюкоза, трис-буфер або сорбітол [35]. Хоча поглиначі OH^\bullet запобігають його реакції з іншими молекулами, включаючи молекули ліпідів, вони не завжди ефективні. Існує кілька причин, які слід розглянути:

1. Реакція радикала OH^\bullet з поглиначем може призвести до утворення радикалів-поглиначів, які можуть реагувати з іншими молекулами в системі [36].

2. OH^\bullet , що утворюється в результаті реакції H_2O_2 з іонами металів, зв'язаними з макромолекулами, можуть реагувати з металозв'язуючими молекулами. Повідомляється, що в результаті утворення комплексу іона Fe (II) та 2-дезоксирибози іон Fe (II), який зв'язується з ДНК, взаємодіє з H_2O_2 з утворенням OH^\bullet , який миттєво пошкоджує ДНК [37]. Встановлено, що іон Fe (III) зв'язується з мембраною, а потім утворює вільні радикали в місці зв'язування. На основі цього було висловлене припущення, що залізо є основним місцем зв'язування сульфанової групи з карбоксильними групами сіалових кислот мембрани, сульфатної групи гліколіпідів та фосфатної головної групи глікопротеїнів і фосфоліпідів [38]. З іншого боку, також повідомлялося, що поглиначі OH^\bullet селективно інгібують утворення OH^\bullet у присутності ЕДТА. Дійсно, ЕДТА дозволяє видаляти іони Fe (II) з цих місць зв'язування [39]. Таким чином, токсичність O_2 та H_2O_2 може бути пов'язана з наявністю та розподілом іонів металів-каталізаторів утворення OH^\bullet у клітинах.

При функціонуванні систем цитохром P₄₅₀ (СYP)/ цитохром P₄₅₀ редуктази (POR), реакція СYP у поєднанні з POR вивільняє супероксид як побічний продукт оксидазної реакції [40]. Ряд гідрофобних сполук, які утворюються в організмі, або ксенобіотиків, включаючи токсиканти і ліки, кон'югують з сульфатом, глюкуронатом і глутатіоном з метою прискореного виведення. СYP діє на першій фазі цих реакцій детоксикації і вводить кисневмісну групу, роблячи їх сприйнятливими до кон'югації. POR передає електрон від NADPH до СYP і забезпечує безперервне насичення субстратних сполук киснем [42]. Гемоксигеназа HO-1 і HO-2, яка окиснює гем, також приймає електрони від NADPH через POR. АФК, які продукуються СYP, пов'язані з мембраною ER і частково локалізовані в мітохондріях, іноді спричиняють окислювальне пошкодження [43]. Печінка є основним органом детоксикації ліків або ксенобіотиків і тому схильна до пошкодження через їх надлишок, що може бути пов'язано з неалкогольними захворюваннями печінки [44]. СYPs також беруть участь у стероїдогенезі в гонадах і продукують АФК як побічні продукти. Таким чином, яєчка у дорослих чоловіків і яєчники у вагітних жінок, піддаються надмірному впливу АФК, що вивільняються СYPs під час стероїдогенезу.

1.3. Особливості процесу пероксидного окислення ліпідів

Ліпіди є найбільш чутливими до дії вільних радикалів біомолекулами, а ненасичені зв'язки жирних кислот і холестеролу в клітинних мембранах дуже легко вступають у реакцію з вільними радикалами, утворюючи продукти пероксидації. Окиснювальний розпад поліненасичених жирних кислот, відомий як пероксидне окиснення ліпідів, є дуже шкідливим. Відбувається він як самопідтримувана ланцюгова реакція [45, 46]. Пероксили ліпідів, які є важливим компонентом клітинних мембран, утворюють RS- і ROO-радикали в присутності перехідних металів, таких як Fe і Cu. Таким чином, солі Fe і Cu збільшують швидкість пероксидного окислення ліпідів і, як наслідок,

зменшують проникність клітинної мембрани та спричиняють порушення її цілісності [46-48].

Пероксидне окислення ліпідів – це вільнорадикальна ланцюгова реакція, яка складається з трьох основних етапів: ініціювання, поширення та завершення. Високоактивні радикали, такі як гідроксильний радикал, атакують поліненасичені жирні кислоти, викликаючи відщеплення атома водню від метиленової (-CH₂-) групи і, таким чином, ініціюють пероксидне окислення ліпідів. Поліненасичені жирні кислоти дуже чутливі до пероксидного окислення, оскільки зі збільшенням кількості подвійних зв'язків у боковому ланцюзі жирної кислоти відщеплення атома водню стає легшим [49]. Однак кон'юговані дієни будуть реагувати один з одним в межах мембран або з іншими мембранними компонентами, такими як білок і холестерол, в умовах, коли кількість O₂ вкрай обмежена [50]. Утворення кон'югованих дієнів супроводжується зміною структури подвійного зв'язку від *цис*-форми до *транс*-форми, що може сприяти більш щільному упакуванню ненасичених жирних кислот, створюючи умови для утворення більш жорстких доменів всередині бішару окисленого ліпиду [51]. Коли атом водню відщеплюється, у вуглеці жирної кислоти залишається тільки один електрон; щоб усунути ослаблення зв'язку C-H в атомі вуглецю, що прилягає до подвійного зв'язку, радикал жирної кислоти утворює кон'югований дієн. Кон'югований дієн реагує з киснем, утворюючи ліпідний пероксильний радикал (LOO[•]); ліпідний радикал, що утворюється на цьому етапі, є важливим, оскільки він запускає ланцюгову реакцію, відриваючи атом водню від іншої жирної кислоти. Пероксильні радикали мають менш реактивні властивості, ніж OH[•], проте вони можуть досягати більш віддалених ділянок. Пероксильні радикали можуть реагувати один з одним, атакувати мембранні білки або відщеплювати атоми водню від сусідніх ланцюгів жирних кислот, що призводить до прогресування ланцюгової реакції пероксидного окислення ліпідів. ПОЛ у біологічних мембранах може призвести до зміни плинності

мембрани та мембранного потенціалу, підвищення проникності для H^+ та інших іонів, а також до порушення цілісності органел або клітин [49].

Процес термінації є останньою стадією пероксидного окислення ліпідів. Під час цього процесу LOO^\bullet -радикали або вступають у взаємний причинно-наслідковий зв'язок (взаємний впливом і руйнуванням), або саморуйнуються і таким чином продовжують утворювати нерадикальні продукти. Незважаючи на потенційну можливість руйнування під впливом високих температур або при контакті з іонами перехідних металів, $LOOH$ є сполуками, які залишаються стабільними при фізіологічних температурах [52]. Утворені вільні радикали (LO^\bullet , LOO^\bullet) та електрофільні продукти (наприклад, 4-гідроксиноненал) можуть реагувати з сусідніми мембранними білками, а також дифундувати з віддаленими молекулами, такими як ДНК [50].

1.4. Механізм окиснювального ушкодження білків

Окиснювальні модифікації білків, здебільшого, вважаються шкідливими, незворотними і, в кінцевому рахунку, такими, що призводять до інактивації, деградації та виведення білків [53, 54]. За десятиліття молекулярних досліджень окислення білків, картина кардинально змінилася, і окислення білків тепер розглядають як двосторонні модифікації: з одного боку, механізми окиснення беруть участь у багатьох нормальних регуляторних процесах (окрім перетворення енергії), таких як модуляція активності ферментів [55], сигналізація або регуляція генів, а з іншого боку, окиснювальні модифікації також виявляються тоді, коли окиснювальний стрес «долає» антиоксидантний захист, в результаті чого проявляється їх згубний вплив [56, 57]. Реакція живих систем на окислювальний стрес має першочергове значення для розуміння клітинного захисту та старіння [58]. Порушення нормального окиснювального метаболізму або пошкодження внаслідок окиснювального стресу також виявилися ключовими чинниками виникнення широкого спектру захворювань, від неврологічних та нейро-

дегенеративних розладів, таких як хвороба Альцгеймера [59], до різних видів раку, діабету та атеросклерозу.

З молекулярної точки зору, окиснення білка призводить до виникнення широкого спектру хімічних модифікацій, починаючи від розщеплення білкової основи або зшивання білків, до модифікацій бічних ланцюгів амінокислот. Більше того, окиснювальне пошкодження може призвести до появи нових хімічно активних груп у білку, таких як альдегідні та кетонні, утворюючи нетрадиційні пептидні хвости як на N-, так і на C-кінцях.

Окиснювальні модифікації білків відбуваються внаслідок атак АФК, таких як пероксид водню (H_2O_2), супероксид аніон (O_2^\cdot) або гідроксильний радикал (OH^\cdot) та активних форм нітрогену (АФН), таких як оксид азоту (NO^\cdot), нітрати (NO_3^-), нітрити (NO_2^-) та пероксинітрити (ONOO^-), як показано на рисунку 2.

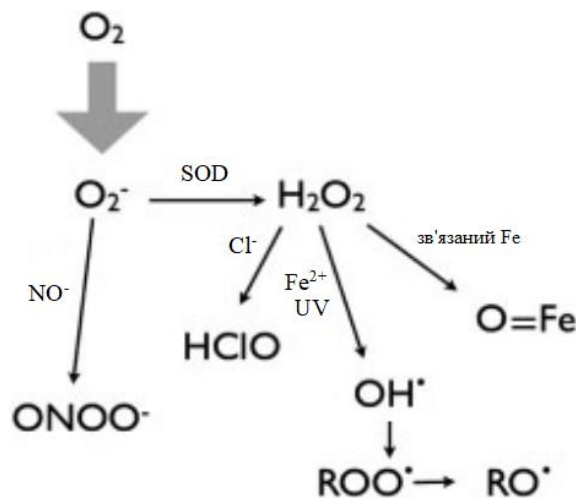


Рис. 2. Шляхи утворення окиснювальних модифікацій білків [60]

Ці види АФК можуть з'являтися як побічні продукти метаболізму кисню, або бути присутніми в навколишньому середовищі, а їх поява є результатом складної взаємодії між власне середовищем та ферментативними механізмами клітини. Атака білків цими високореактивними видами АФК може призвести до модифікації амінокислотного ланцюга, розщеплення білкової основи, утворення карбонільних похідних і формування зшитих білкових комплексів. Деякі реакції є обмеженими і специфічними для певних

залишків, тоді як інші призводять до широко розповсюджених неспецифічних модифікацій. Крім того, активні форми кисню та азоту також відповідальні за пошкодження основ ДНК і вуглеводних фрагментів, а також деградацію ліпідів у результаті пероксидного окислення, побічні продукти якого, в свою чергу, можуть модифікувати білки.

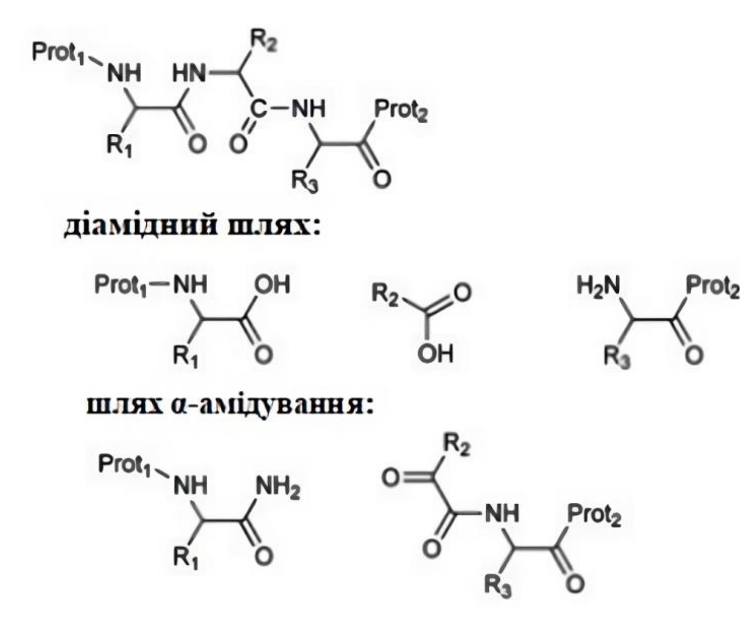


Рис. 3. Розщеплення білкової основи за діамідним шляхом (вгорі) та α -амідним шляхом (внизу). Верхня структура – нативний білок, де Prot1 – це N-кінцева сторона білка, а Prot2 – C-кінцева сторона.

Крім того, окиснення залишків глутаміну та проліну також може призводити до одноосновного розщеплення. Розщеплення за залишком глутаміну призводить до утворення амідів на C-кінцевому боці N-кінцевої частини білка, і пірвіловий залишок на N-кінцевій стороні C-кінцевої частини білка [65].

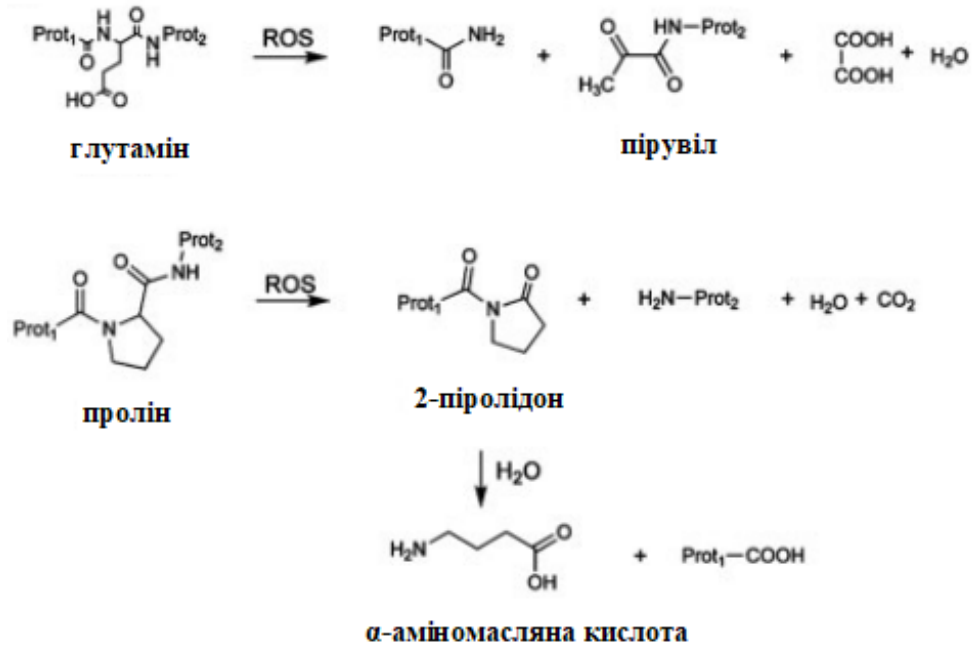


Рис. 4. Розщеплення білкової основи шляхом окиснення залишків глутаміну та проліну

Нарешті, бета-розщеплення може відбуватися через атаку радикалів у положенні β (C3), як показано на рисунку 5 [61, 66, 67]. Вивільнення бічного ланцюга у вигляді вугільної кислоти, вивільнення бічного ланцюга у вигляді карбонільної сполуки залишає α -радикал на α -вуглеці, який потім піддається розщепленню за механізмами, подібними до розщеплення діаміду або α -амідування.

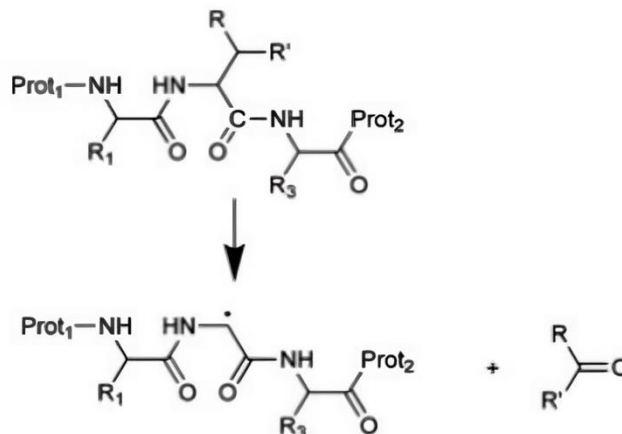


Рис. 5. β -розщеплення залишку бічного ланцюга (аланіну, валіну, лейцину або аспартату)

Пероксинітрит (ONOO^-) – це сильний окислювач з коротким періодом напіврозпаду. Після утворення він може безпосередньо піддаватися окисленню з кількома біологічними мішенями або генерувати радикали, що згодом призводять до реакцій окислення та нітрування.

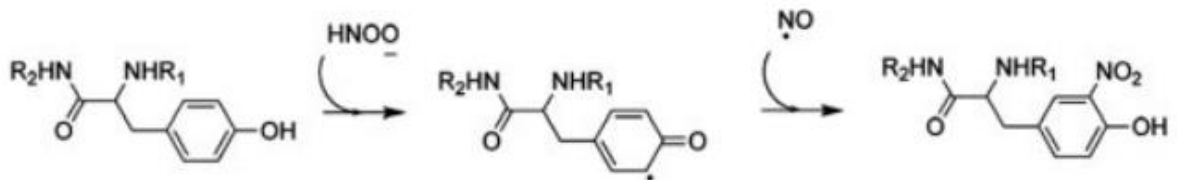


Рис. 6. Процес утворення 3-нітротирозину

Наприклад, нітрування тирозину відбувається за двоступеневим механізмом: (1) утворюється тирозильний радикал, (2) тирозильний радикал реагує з вільним радикалом NO^\bullet з утворенням 3-нітротирозину (рис. 6) [68].

1.5. Особливості функціонування м'язів за умов оксидативного стресу

Жорстка регуляція гомеостатичних процесів на рівні клітин, тканин, органів та організму є необхідною для життя, а порушення гомеостазу пов'язане з виникненням цілого спектру захворювань. Зокрема, окисно-відновний гомеостаз тонко регулюється, оскільки низький або помірний рівень активних форм кисню (АФК) або активних форм нітрогену (АФН) є важливими фізіологічними сигнальними молекулами. Окислювальний стрес (ОКС) – порушення окисно-відновного гомеостазу, що полягає в дисбалансі між утворенням АФК та/або АФН та здатністю біологічної системи до швидкої детоксикації реактивних проміжних продуктів або до відновлення ушкоджених елементів. Найчастіше ОКС асоціюється з патологічними станами. У свою чергу мітохондрії виробляють більшу частину клітинної енергії і зазвичай розглядаються в ролі основного місця утворення вільних радикалів та окиснювального стресу. Однак, наприклад, нікотинамід аденіндинуклеотидфосфат оксидази (NOX), ліпоксигенази або ксантинооксидаза (ХО) також є важливими джерелами АФК [69].

Скелетні м'язи, найбільший тип тканин в організмі людини, мають специфічні характеристики, наприклад, значні потреби в енергії, кальцієвих сигналах та інтенсивному метаболізмі, поряд зі здатністю до регенерації після пошкодження або інтоксикації шляхом рекапітуляції процесу міогенезу, який залежить від активації м'язових стовбурових клітин (сателітів), які можуть диференціюватися в міотрубки і, зрештою, м'язові волокна [70]. Підтримка архітектури м'язів, яка є високоорганізованою та оформленою для оптимізації скорочення та генерації сили, потребує базальної енергії. Крім того, м'язові клітини споживають велику кількість кисню, яка значно збільшується під час фізичних навантажень або в результаті інтоксикації певними речовинами (наприклад, ацетамінофеном), і це споживання O_2 пов'язане з безперервним утворенням АФК/АФН. Ці реактивні АФК є важливими сигнальними молекулами, необхідними для роботи м'язів і для гнучких адаптивних реакцій відповіді на стрес та/або фізичне зусилля [69]. Однак надмірний рівень АФК/АФН, які не контролюються антиоксидантним захистом, негативно впливають на скоротливі білки м'язів, мітохондріальні фосфоліпіди або ДНК, і залучаються до патофізіології старіння м'язів (саркопенії) та різних м'язових розладів, таких як м'язова дистрофія Дюшена, серцевинна міопатія, злаякісна гіпертермія, м'язова втома та атрофія [71].

Більшість АФК/АФН є лабільними, а їх вплив залежить від багатьох факторів, таких як низьких та/або високих концентрацій середовища, супутніх ушкоджень, що ускладнює їх визначення як фізіологічних сигнальних молекул або стресових факторів, які призводять до розвитку патологічних станів. Супероксидний радикал $O_2^{\cdot -}$ є "первинним" видом АФК, що продукується переважно мітохондріями, перетворюючись на "вторинні" АФК безпосередньо через ферментні або каталізовані металами процеси хімічних перетворень [72]. Порівняно з $O_2^{\cdot -}$ і OH^{\cdot} , H_2O_2 має найнижчу реакційну здатність, найвищу стабільність з періодом напіврозпаду близько 10^{-5} секунд і найвищу внутрішньоклітинну концентрацію, близько 10^{-7} М

[72]. Щоб підтримувати АФК / АФН на безпечному рівні, скелетні м'язи та міогенні клітини оснащені потужним ферментативним та неферментативним антиоксидантним захистом, що робить їх чутливими до змін окисно-відновного середовища. Серед ферментативних антиоксидантів, супероксиддисмутаза (SOD) каталізує перетворення $O_2^{\cdot-}$ в H_2O_2 , який потім може бути перетворений на H_2O . SOD1-3 (Cu/ZnSOD) містить мідь і цинк, а SOD2 (MnSOD) містить марганець в активному центрі [73]. Відсутність SOD1 призводить до підвищеного оксидативного стресу та прискореної вікової атрофії скелетних м'язів [74]. Каталітичне розкладання H_2O_2 може відбуватися за участю декількох ферментів, таких як гем-залежний фермент каталаза (CAT) або глутатіонпероксидази (GPx). Останні належать до родини селенопротеїнів, що характеризуються наявністю принаймні одного селеноцистеїну, амінокислоти, яка є біологічною формою селену. У ссавців існує щонайменше п'ять селеноцистеїновмісних GPx (GPx1-4 та GPx-6) [75]. GPx відновлюють гідропероксиди ліпідів до відповідних спиртів і відновлюють вільний H_2O_2 до H_2O , що супроводжується окисленням відновленого/мономерного глутатіону (GSH, присутній у мілімолярних концентраціях у м'язових клітинах).

Відновлений глутатіон надалі утилізується з GSSG за допомогою глутатіонредуктази, причому співвідношення GSH/GSSG є індикатором редокс-статусу клітини [75]. Як і для SOD, активність GPx збільшується в м'язах після надмірного фізичного навантаження, тоді як активність каталази, як правило, залишається незмінною [76]. Антиоксидантна мережа також включає розчинні неферментативні антиоксиданти, такі як вітаміни А, С і Е, креатин, білівердин та його похідні білірубін і глутатіон [70, 73].

Клітинна відповідь на окиснювальний стрес у м'язах також включає щонайменше чотири ключові фактори, що беруть участь у регуляції транскрипції: ядерний фактор каппа В (NF- κ B), активаторний білок 1 (AP-1), ядерний фактор (еритроїдопохідний 2), подібний до ядерного фактора 2 (відомий як NFE2L2 або NRF2) та активований проліфератором пероксисом

рецептор гамма-коактиватора 1-альфа (PGC-1 α) [69, 73]. Промотор кожного з трьох основних антиоксидантних ферментів SOD2, CAT і GPx містить, серед інших специфічних ділянок, NF- κ B і AP-1 консенсусну послідовність [77]. Окиснювальний стрес регулює активність NF- κ B, а утворення димерів AP-1 залежить від окисно-відновного середовища [76]. Аналогічно, фізіологічна експресія гена PPARGC1A що кодує Pgc-1 α , потребує оптимальної концентрації АФК у скелетних м'язах [72], а активність Nrf2 визначається редокс-статусом [80]. За нормальних умов Nrf2 швидко деградує за убіквітин-протеасомним шляхом через взаємодію з Keap1 (білком-адаптером субстрату убіквітинлігази E3 на основі Cul3). За окиснювального стресу активні залишки цистеїну в Keap1 окиснюються, що призводить до дисоціації Nrf2 від Keap1 та їх активації. Вільний Nrf2 потім транслокується до ядра і утворює гетеродимер з білками Maf. Цей комплекс активує транскрипцію цитопротекторних генів (HO-1, NQO1, PRDX1, GST та ін.) через зв'язування з елементом антиоксидантної відповіді (ARE), що міститься в їхніх промоторах [73].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти та методи досліджень

Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою ~ 250 г, яких утримували за вільного доступу до води. Експерименти проводилися на тваринах відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідження чи в інших наукових цілях» (Стразбург, 1986 р.) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Тривалість експерименту становила 28 днів. Тварин були розділені на 4 групи:

1 група контроль (К) – тварини даної групи споживали раціон, який складав 14% протеїну, 10% жиру та 76% вуглеводів (10% з яких складала сахароза), збалансований за усіма необхідними компонентами.

2 група – тварини, які споживали низькопротеїновий раціон (НПР) – (1/3 добової норми білка, 10% жирів і 85,3% вуглеводів).

3 група – тварини, яким упродовж останніх двох днів експерименту вводили токсичну дозу ацетамінофену та які споживали збалансований за усіма необхідними компонентами раціон.

4 група – тварини, які споживали раціон з низьким вмістом білка та отримували упродовж останніх двох днів експерименту токсичну дозу ацетамінофену (НПР/ТУ).

Декапітацію експериментальних щурів здійснювали під легким ефірним наркозом на 29-у та 31-у доби експерименту.

2.2. Виділення мітохондріальної фракції

Виділення мітохондріальної фракції скелетних м'язів щурів здійснювали методом диференційного центрифугування. Всі операції проводили при 0 – 4 °С.

У декапітованих щурів вирізали м'язи передніх та задніх кунцівок, та поміщали їх в холодне іонне середовище виділення (0,1 М КСl, 1мМ MgCl₂, 0,05 М Tris-HCl, рН 7,4). Очищені м'язи подрібнювали ножицями, додавали середовище виділення у співвідношенні 1:4. Суміш гомогенізували упродовж 1 хв, гомогенат центрифугували 10 хв при 6000 g, осаджуючи ядра та уламки клітин. Надосадову рідину знову центрифугували 5 хв при 2000g для ефективнішого видалення міофібрил. Отриманий супернатант фільтрували через 4 шари марлі та центрифугували 10 хв при 9000 g. До отриманого осаду мітохондрій додавали 3 мл середовища виділення, що містив 0,1% бичачий сироватковий альбумін (БСА) та зберігали на льоду.

Вміст протеїну у мітохондріальній фракції скелетних м'язів визначали стандартним методом Лоурі.

2.3. Визначення супероксид аніон радикалу

Принцип методу полягає в реакції відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) супероксид аніон радикалом з утворенням забарвленого диформагану, який має максимум поглинання при $\lambda=540$ нм. НАДН є індуктором, який використовують для оцінки потенційної генерації супероксид аніон радикалу в мітохондріальній фракції.

В пробірку вносили 0,05 мл мітохондрій 0,05 мл фосфатного буферного розчину (рН 7,4) та 0,05 мл 3% розчину НАДН. Перемішували та інкубували 10 хв при 37 °С. Додавали 0,05 мл 0,2% розчин НСТ, після чого інкубували 5 хв при 37 °С. Додавали 2 мл розчину хлороформу та диметилсульфоксиду у співвідношенні 1:2 і перемішували 1 хв, після чого центрифугували 5 хв при 1500 об/хв.

Супернатант фотоколориметрували проти контролю при $\lambda=540$ нм.

2.4. Визначення ТБК-активних продуктів

МДА, взаємодіючи з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) в кислому середовищі під час кип'ятіння, утворює забарвлений комплекс з максимумом поглинання при $\lambda = 532$ нм.

У центрифужні пробірки вносили 0,1 мл мітохондріальної фракції додавали 1 мл 17% ТХО та 2,5 мл 0,025 М Tris-HCl буфер (pH 7,4), після чого проби центрифугували 15 хв при 4000 об/хв. 2 мл отриманого супернатанту відбирали та переносили в інші пробірки. Додавали 1мл 0,8% ТБК, після чого інкубували на водяній бані 10 хв при 100°C до появи рожевого забарвлення.

Отримані результати розраховували, враховуючи коефіцієнт поглинання МДА, який дорівнює $1,56 \cdot 10^5$ моль \cdot см⁻¹.

2.5. Визначення вмісту карбонільних похідних

Принцип методу базується на взаємодії окислених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразином (ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів.

У контрольну та дослідну пробу вносили 0,05 мл мітохондріальної фракції. Для осадження білків в контрольну і дослідну пробу додавали по 1 мл 20% розчину трихлороцтової кислоти та центрифугували 5 хв при 3000 об/хв. До осаду в контрольну пробу додавали 1 мл 2М HCl, а в дослідну пробу додавали 1 мл 2,4-ДНФГ. Всі проби інкубували при 37°C 1 годину, центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. До осаду додавали 1 мл розчину етанол:етилацетату у співвідношенні 1:1 і центрифугували 5 хв при 3000 об/хв. Отриманий осад промивали ще 2 рази. До осаду додавали 2,5 мл 8М сечовини і нагрівали на водяній бані до розчинення впродовж 5 хв при 100°C. Вміст пробірок вимірювали на спектрофотокориметрі при $\lambda=370$ нм.

Кількість 2,4-ДНФГ розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції рівний $21 \cdot 10^2$ моль \cdot см⁻¹.

2.6. Визначення SH-(тіольних) груп в мітохондріях

Принцип методу полягає в утворенні тіонітрофенільного аніону, концентрація якого прямопропорційна кількості вільних SH-груп, що прореагували з реактивом Елмана.

В центрифужні пробірки додавали 0,1 мл суспензії мітохондрій та 1 мл 20% ТХО, після чого центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. До осаду додавали 2 мл буферу (рН 7,4) і центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. До осаду додавали 2 мл суміші етанол:етилацетату (1:1), центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. Після цього до осаду додавали по 3 мл розчину 8М сечовини та калій фосфатного буферу з EDTA (рН 7,4) та інкубували на водяній бані упродовж 10 хв при 100°C. Після інкубації вміст пробірок центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. По 2 мл надосаду відбирали в контрольну і дослідну пробірки, в контрольну та дослідну пробу додавали 1 мл калій фосфатного буферу з EDTA (рН 7,4). В контрольну пробу додавали 0,02 мл H₂O, а в дослідну 0,02 мл реактиву Елмана. Через 30 хв оптичну густину проб вимірювали на спектрофотометрі при $\lambda=412$ нм.

2.7. Визначення швидкості продукції НО[•]

У пробірки вносили 2 мл інкубаційного середовища, що містило 20 ммоль дезоксирибози, 1 ммоль H₂O₂ та 20 ммоль натрій-фосфатного буфер (рН 7,4), та 0,2 мл суспензії мітохондрій, інкубували 30 хв при 37 °С. Після інкубації додавали 0,5 мл 1% розчину ТБК, приготовленого на 50 ммоль NaOH, та 0,5 мл 2,8% ТХО. Суміш інкубували 20 хв на водяній бані 10 хв при 100°C. Після охолодження вміст пробірок вимірювали на спектрофотометрі при $\lambda=532$ нм.

2.8. Визначення активності супероксиддисмутази

Метод визначення активності супероксиддисмутази (СОД) ґрунтується на вимірюванні утворення продукту окиснення адреналіну, що поглинає світло в області 347 нм. Цей продукт утворюється в умовах відсутності додаткових джерел генерації O₂⁻ та є особливо чутливим до СОД.

В контрольну пробу вносили 2,8 мл карбонатного буферу (рН 10,65) та 0,2 мл 0,1% розчину адреналіну. В дослідну пробу вносили 2,7 мл карбонатного буферу (рН 10,65), 0,1 мл мітохондрій та 0,2 мл адреналіну.

Після внесення адреналіну пробу вимірювали протягом 3 хв кожні 60 с при $\lambda=347$ нм.

Статистична обробка результатів

Для перевірки достовірності результатів виконано статистичну обробку в програмі «Microsoft Excel» з використанням t-критерію Стьюдента. Результати вважали достовірними, якщо $P \leq 0,05$, та представляли як середнє значення незалежних визначень \pm похибка середнього.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ацетамінофен (АРАР) може впливати на м'язову тканину через різні механізми, зокрема через утворення токсичного метаболіту, відомого як N-ацетил-*n*-бензохінон-імін (NAPQI). Підвищення рівня NAPQI в м'язовій тканині може призвести до окисного стресу та утворення активних форм кисню (АФК), таких як гідроксильний радикал та пероксид водню. Підвищений рівень АФК може спричинити окиснювальний стрес у м'язах, порушити цілісність клітинних мембран та білків, сприяючи пошкодженню клітинних компонентів.

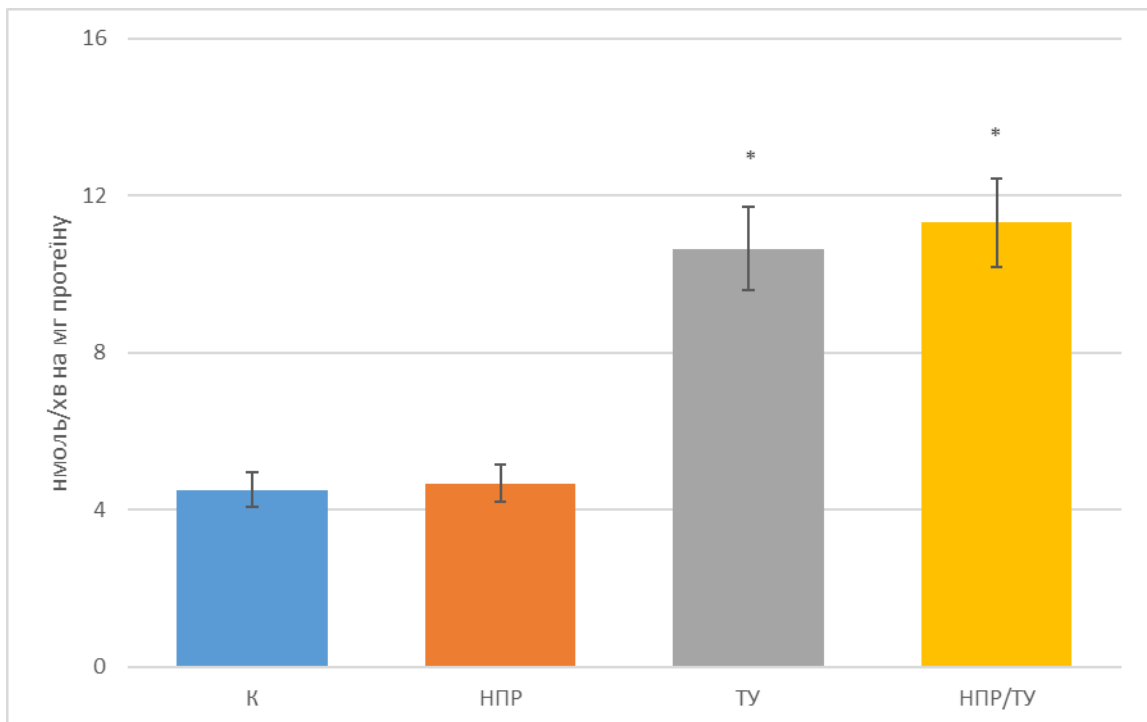
Результати проведених досліджень показали, що в мітохондріальній фракції скелетних м'язів тварин, які споживали низькопротеїновий раціон (НПР), не спостерігається достовірного підвищення генерації супероксид-аніон радикалу (рис. 3.1). Водночас у тварин цієї групи спостерігалось достовірне підвищення гідроксильного радикалу (рис 3.2).

Низький рівень протеїну в раціоні тварин впливає на мітохондрії, що може призвести до порушень у мітохондріальному дихальному ланцюгу та окисному фосфорилуванні, що безпосередньо впливають на утворення аденозинтрифосфату (АТФ).

АФК утворюється переважно в дихальному ланцюзі, де ключовим місцем синтезу АФК вважається точка взаємодії убіхінону з цитохромоксидазою в III комплексі. Під час цих процесів відбувається передача електронів через комплекси білків, які утворюють дихальний ланцюг, з одного білка до іншого. За умови передачі електронів можуть виникати "вільні" електрони, які реагують з молекулами кисню, що присутні в мітохондріях. Окрім того, АФК окислюють фосфоліпіди біомембран, змінюючи їх проникність; руйнують нуклеотиди ДНК та РНК, руйнують білки. В кінцевому результаті це призводить до загибелі клітини.

Виявлено, що у тварин групи ТУ рівень генерації АФК в мітохондріальній фракції скелетних м'язів зростає приблизно у 2 рази порівняно зі значеннями контролю (рис. 3.1, рис. 3.2).

В літературі показано що токсичність АРАР проявляється в результаті утворення токсичного метаболіту NAPQI під час окиснення мікросомальною системою цитохрому Р450, зокрема СYP2E1. NAPQI, який присутній в надлишкових кількостях, посилює виснаження запасів глутатіону (GSH). Це у свою чергу може призводити до виснаження запасів АТФ [79]. Є докази, що підтверджують теорію про те, що NAPQI зв'язується з низкою клітинних білків, особливо з мітохондріальними білками. Приєднання до мітохондріальних білків, особливо в умовах виснаження GSH, важливо, оскільки зв'язування з мітохондріальними білками виснажує антиоксидантні системи, а також змінює α -субодиницю мітохондріальної АТФ-синтази, що



призводить до неефективної продукції АТФ [80].

Рис. 3.1. Генерація супероксид-аніон радикалу у мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі дефіциту протеїну

Примітка (тут і надалі): К – контрольна група тварин; НПР – тварини, які отримували низькопротеїновий раціон; ТУ – тварини, яким вводили токсичну дозу ацетамінофену; НПР/ТУ – тварини, які отримували низькопротеїновий раціон та яким вводили токсичну дозу ацетамінофену

Зазвичай невелика кількість NAPQI безпечно метаболізується антиоксидантними системами організму, глутатіоном, але великі дози ацетамінофену можуть вичерпати запаси глутатіону та призвести до утворення токсичного NAPQI [81].

У тварин групи НПР/ТУ генерація супероксиду в мітохондріальній фракції скелетних м'язів зростає в 2 рази порівняно з контрольною групою (рис. 3.1).

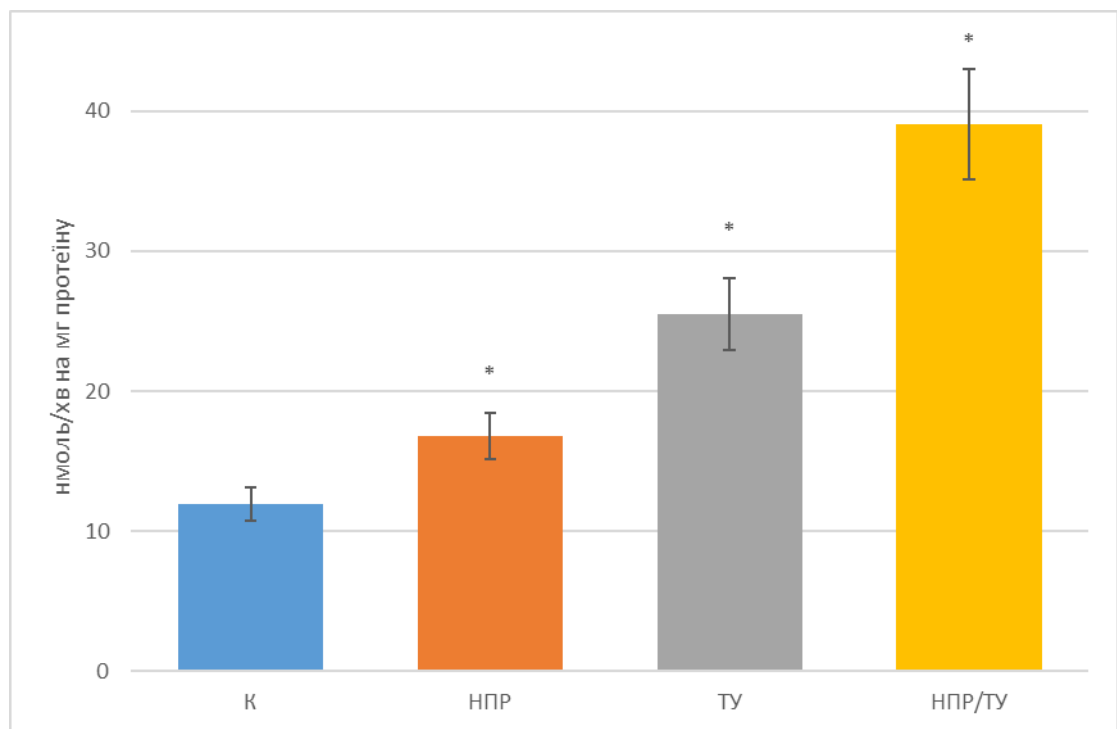


Рис. 3.2. Генерація гідроксильного радикалу HO• у мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі дефіциту протеїну

Водночас у тварин цієї групи генерація гідроксильного радикалу в мітохондріальній фракції скелетних м'язів збільшується в приблизно 3 рази (рис 3.2). Високореактивний гідроксильний радикал викликає окисне пошкодження ДНК, ліпідів і білків [82]. Також значна кількість активного

пероксиду водню у присутності відновленого феруму ініціює реакцію, яка протікає за механізмом Фентона з утворенням ще однієї активної форми кисню – гідроксильного радикалу OH^\bullet : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe(II)} \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe(III)}$.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що основним стимулом для збільшення виробництва АФК, є токсичний вплив ацетамінофену.

Відомо, що мішенями дії АФК є ліпіди та білки, викликаючи зміну їх структури. Ці АФК можуть запускати реакції пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ). При реакції дисмутації двох супероксидних радикалів утворюється молекула пероксиду водню (H_2O_2).

Токсичним для організму є не тільки пероксид, а також альдегіди, кетони, кислоти. Ці карбонільні продукти ПОЛ можуть пригнічувати активність ферментів, впливати на синтез ДНК, збільшувати проникність капілярів, впливати на агрегацію тромбоцитів тощо [83]. Таким чином, активація ПОЛ може відігравати ключову роль у пошкодженні мембранних структур тканин і органів.

Для визначення процесів окислення ліпідів (ПОЛ) досліджують його маркери, такі як ТБК-активні продукти. До ТБК-активних продуктів належать МДА. Результати проведених досліджень показали, що в мітохондріальній фракції скелетних м'язів тварин, яких утримували на низькопротеїновому раціоні, рівень ТБК-активних продуктів не відрізняється порівняно з показниками контрольної групи (рис. 3.3). Проте в групі тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном вміст ТБК-активних продуктів вище майже в 2 рази порівняно з показниками контролю. Аналогічна картина характерна для тварин групи НПР/ТУ. Дані результати свідчать про те, що основний вплив на генерацію ТБК-активних продуктів має саме токсичне ураження ацетамінофеном.

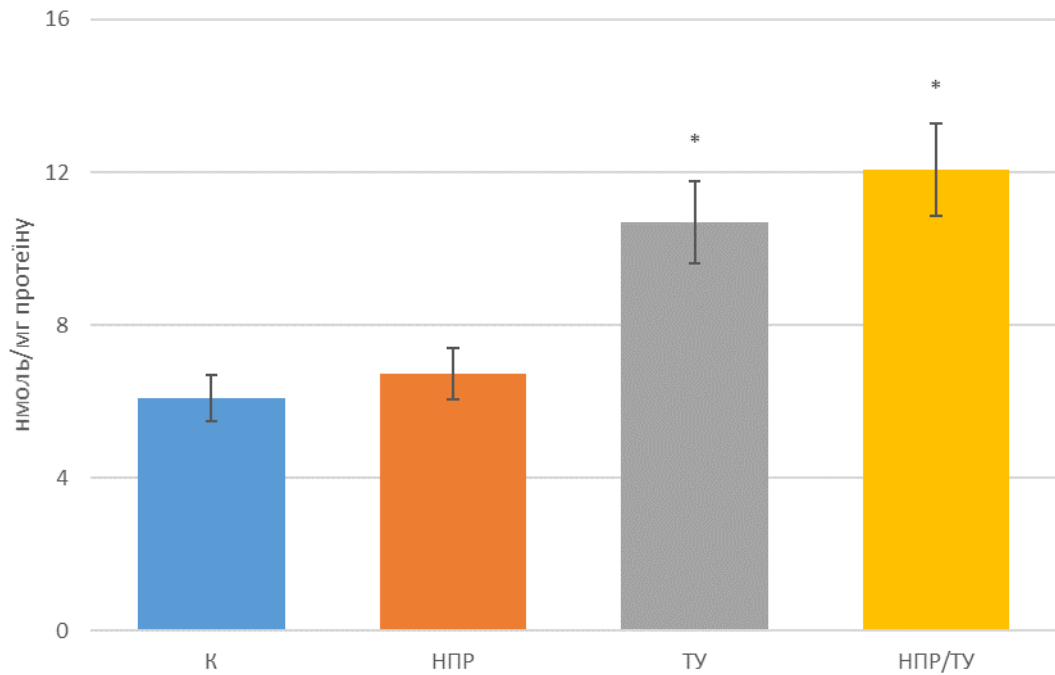


Рис 3.3 Вміст ТБК-активних продуктів у мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі дефіциту протеїну

МДА утворює зв'язки між молекулами ліпідів і знижує лабільність мембрани. Це призводить до зниження гнучкості та лабільності мембран. Порушуються процеси, пов'язані зі зміною поверхні мембрани: фагоцитоз, піноцитоз, клітинна міграція та ін. В результаті мембрана стає вразливішою та схильною до руйнування.

ПОЛ має широкий спектр впливу. Окиснення ліпідів призводить до пошкодження білкових компонентів мембран, зокрема, рецепторів та каналів, що впливає на ефективність сигнальних процесів у клітині. Збільшення ПОЛ викликає зміни у розподілі та організації ліпідів у мембрані, порушуючи її структуру, що призводить до втрати її функцій. Також ПОЛ спричиняє збільшення проникності мембран для різних речовин, включаючи іони

Окрім ліпідів, мішенню дії АФК є протеїни, насамперед мітохондріальні. Відомо, що продуктами окиснення протеїнів є карбонільні похідні. Карбонільні похідні утворюються під час взаємодії амінокислот,

таких як лізин або пролін, з реактивними формами кисню, наприклад, пероксидом водню (H_2O_2).

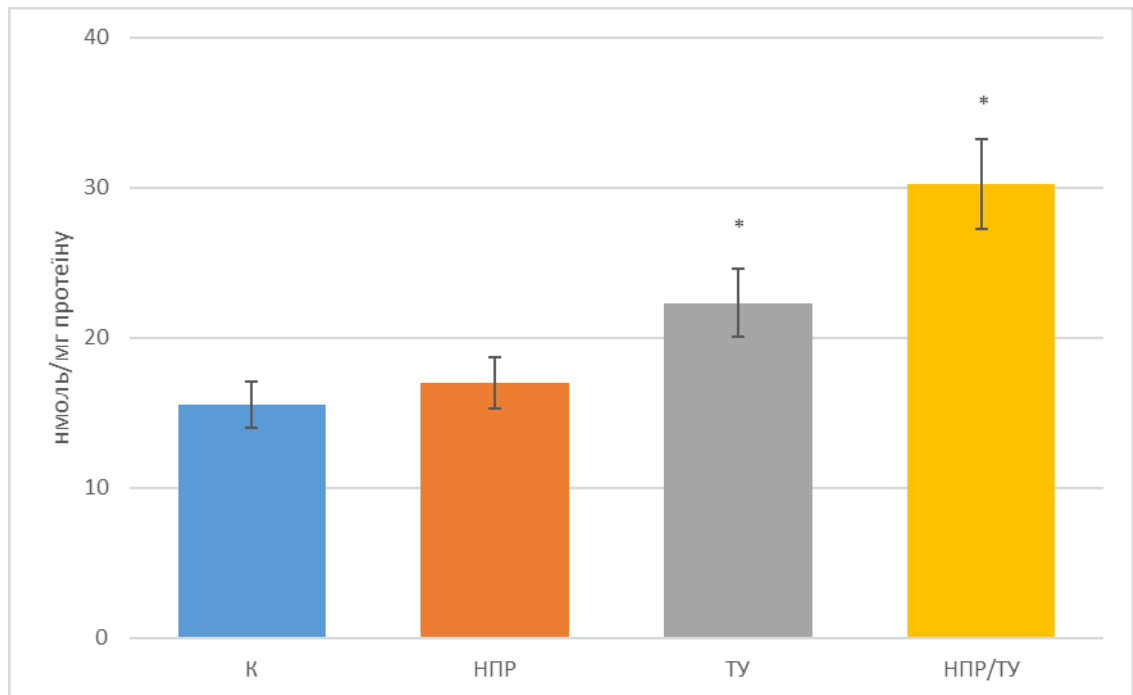


Рис 3.4 Вміст карбонільних похідних у мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі дефіциту протеїну

Також ступінь окиснювального ушкодження протеїнів визначають за вмістом вільних протеїнових SH-груп. Відомо, що окиснення протеїнів може впливати на їхню структуру та функції через різноманітні механізми, одним з яких є окиснення сульфгідрільних (-SH) груп, які присутні в амінокислотах цистеїну. Вільні SH-групи відіграють важливу роль у підтримці структури протеїнів та їхньої активності. Ці групи можуть брати участь у утворенні дисульфідних зв'язків між різними частинами протеїнів, що допомагає утримувати їх у правильній тривимірній конфорації.

Окиснення вільних SH-груп може призводити до утворення дисульфідних містків між двома молекулами цистеїну або може взаємодіяти з іншими окиснювальними видами кисню, утворюючи сульфатні групи. Ці зміни можуть порушити структуру протеїнів та впливати на їхнє функціонування.

За вмістом вільних SH-груп можна визначити ступінь окиснювального ушкодження протеїнів: зниження їх вмісту може свідчити про окиснення та може слугувати індикатором окиснювального стресу в клітинах. [84]

Наші дослідження показали, що в групі тварин, яких утримували на низькопротеїновому раціоні, в мітохондріальній фракції скелетних м'язів вміст карбонільних похідних приблизно на рівні контрольної групи (рис. 3.4), проте за досліджуваних умов нами встановлено достовірне зниження вмісту вільних SH-груп у мітохондріальних протеїнах (рис. 3.5). Імовірно, встановлений факт зниження вмісту SH-груп пов'язаний з показаним нами посиленням утворенням гідроксильного радикалу. Відомо, що зниження вмісту сульфгідрільних (-SH) груп у протеїнах пов'язане з підвищеним утворенням гідроксильних радикалів. Гідроксильні радикали мають високу хімічну активність і можуть реагувати з різними компонентами клітини, включаючи білки з їх SH-групами. Ця реакція призводить до окиснення та ушкодження SH-груп, що впливає на структуру та функції протеїнів.

Водночас за умов токсичного ураження спостерігається підвищення вмісту карбонільних похідних у приблизно 1,5 рази порівняно з контрольною групою тварин (рис. 3.4), тоді як вміст вільних SH-груп знижується приблизно у 3 рази (рис. 3.5). Проте максимальне накопичення карбонільних похідних та зниження вмісту SH-груп мітохондріальних протеїнів у скелетних м'язах спостерігається у тварин групи НПР/ТУ (рис. 3.4, рис. 3.5).

Отримані результати узгоджуються із показаною нами інтенсифікацією продукування АФК за умов впливу токсичних доз ацетамінофену на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

Ключова роль у захисті клітин від окисного стресу відводиться системі глутатіону, яка нейтралізує ПОЛ і підтримує у відновленому стані SH-групи білків. HO^\bullet діє на білкові SH-групи, розриваючи дисульфідні зв'язки, що призводить до денатурації білків та інактивації ферментів мітохондріальної мембрани.

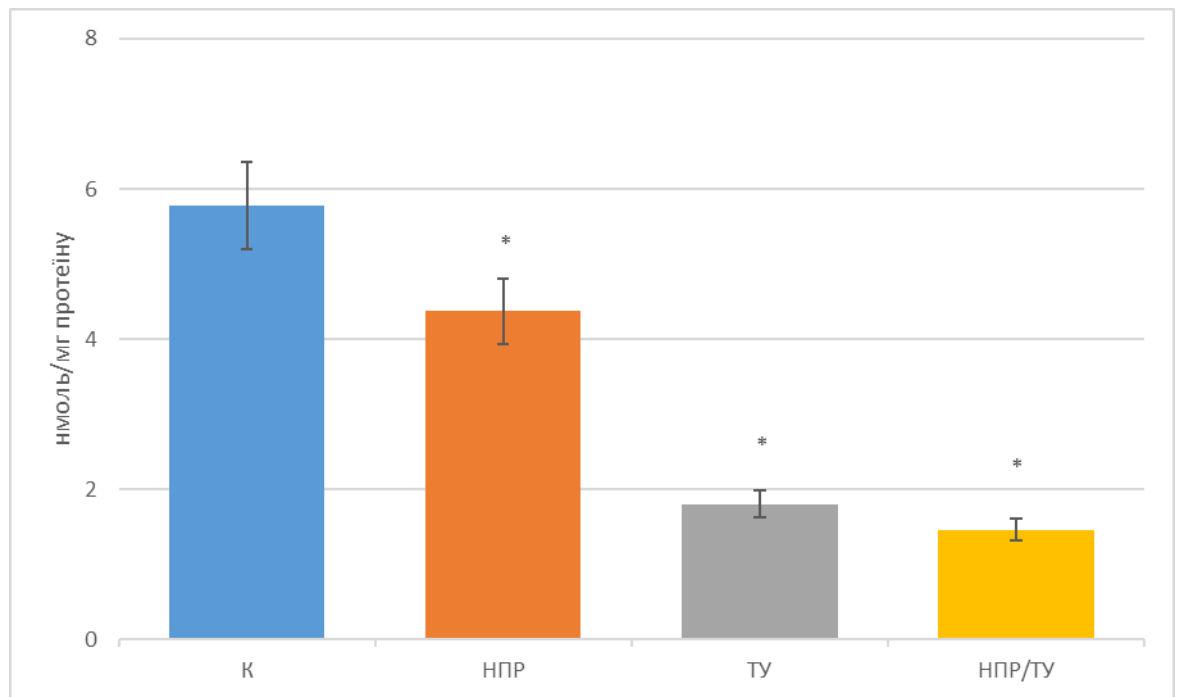


Рис. 3.5. Вміст білкових SH-груп у мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі дефіциту протеїну

Отже, за умов токсичного ураження ацетамінофену на тлі дефіциту протеїну у мітохондріях скелетних м'язів спостерігається максимально виражена інтенсифікація продукування супероксидного та гідроксильного радикалів на тлі накопичення ТБК-активних продуктів та карбонільних похідних при одночасному зниженні вмісту протеїнових SH-груп, що свідчить про активацію вільнорадикальних процесів. Наслідком встановлених змін може бути порушення структурно-функціональної організації макромолекул скелетних м'язів, що надалі може призводити до порушення скоротливої здатності м'язів.

Важливими для захисту від ушкоджень, спричинених АФК, є такі ензими як супероксиддисмутаза та каталаза. Вони здатні нейтралізувати вільні радикали та зменшити окиснювальний стрес, що може виникнути в результаті утворення NAPQI у м'язовій тканині.

СОД це ензим, який каталізує перетворення супероксидного радикалу ($O_2^{\cdot-}$) у пероксид водню (H_2O_2) та молекулярний кисень (O_2). Пероксид

водню, в свою чергу, може бути нейтралізований каталазою, зменшуючи потенційно шкідливі ефекти супероксиду.

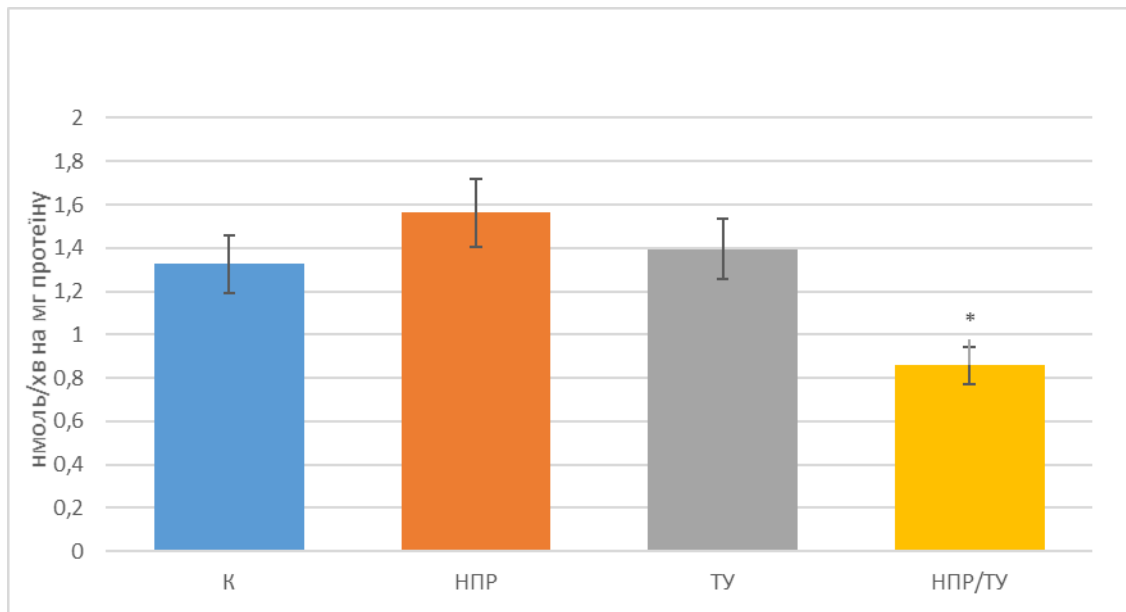


Рис. 3.6. Активність супероксиддисмутази у мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі дефіциту протеїну

Наші дослідження показали, що в групі тварин, яких утримували на низькопротеїновому раціоні та групі тварин, які отримували токсичну дозу ацетамінофену, в мітохондріальній фракції скелетних м'язів активність СОД не змінюється порівняно з контрольною групою. Проте, в групі тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном, яка споживала низькопротеїновий раціон, спостерігається зменшення рівня СОД в майже 1,5 разів (рис. 3.6.).

Отже, максимально виражені вільнорадикальні процеси характерні для тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном, яких утримували за умов білкової недостатності, про що свідчить інтенсифікація генерації АФК, накопичення продуктів окиснювального ушкодження ліпідів та протеїнів на тлі зниження активності супероксиддисмутази. Наслідком встановлених змін може бути порушення функціональної активності клітин скелетних м'язів, зокрема їх скоротливої здатності.

ВИСНОВОК

1. Встановлено, що у тварин, які споживали низькопротеїновий раціон генерація супероксид-аніон радикалу, вміст ТБК-активних продуктів та карбонільних похідних, а також активність супероксиддисмутази не відрізняються від показників контрольної групи щурів. Водночас у тварин цієї групи спостерігається достовірне збільшення генерації гідроксильного радикалу HO^\bullet та зменшення вмісту білкових SH-груп.

2. Показано, що у тварин, які отримували токсичні дози ацетамінофену, спостерігалось підвищення генерації супероксид-аніон радикалу та гідроксильного радикалу, підвищення вмісту ТБК-активних продуктів та карбонільних похідних на тлі зниження вмісту білкових SH-груп та збереженні активності супероксиддисмутази на рівні контролю.

3. Встановлено, що максимально виражені вільнорадикальні процеси характерні для тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном, яких утримували за умов білкової недостатності, про що свідчить інтенсифікація генерації АФК, накопичення продуктів окиснювального ушкодження ліпідів та протеїнів на тлі зниження активності супероксиддисмутази.

Отже, введення ацетамінофену на тлі дефіциту протеїну у раціоні індукує вільнорадикальні процеси у скелетних м'язах щурів, наслідком чого може бути порушення функціональної активності клітин скелетних м'язів, зокрема їх скоротливої здатності.